

## II. METODOLOGI PENELITIAN

### 3.1 Waktu Dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Pertanian dan Peternakan, Universitas Muhammadiyah Malang. Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Februari sampai dengan Mei 2018.

### 3.2 Alat dan Bahan Penelitian

#### 3.2.1 Alat

Alat – alat yang dipergunakan pada penelitian ini meliputi panci, kompor, penyaring (kain), kapas, pengaduk, blender merk miyako, sendok, pisau, talenan, baskom, corong plastik, gelas ukur merk Herma, tabung reaksi merk Iwaki, erlemeyer Iwaki, *vortex* tipe M37610-33 Barnstead, *sentrifuse* PLC series tipe Lab 08, spektrofotometer UV-Vis Genesys 20, timbangan analitik digital AAA 250 LL, *hand* refraktometer merk ATAGO tipe N-1  $\alpha$  (No. 2211), pH meter tipe Lab 875, desikator, cawan porselen, oven tipe MB6 WTC binder, *waterbath* merk Digital Thermost, lemari asam, pipet ukur merk Iwaki, pipet tetes, aluminium foil, botol vial, mortal-martil, kamera digital, dan perlengkapan alat tulis lainnya.

#### 3.2.2 Bahan

Bahan yang diperlukan pada penelitian ini antara lain kacang tunggak varietas KT 3 yang diperoleh dari Pasar Gotong – royong, Yosowilangun, Lumajang dan daun pandan wangi yang berwarna hijau muda dan berukuran lebih kecil dari pada daun suji yang diperoleh dari Pasar Dinoyo, Malang. Bahan-bahan untuk pembuatan sari kecambah kacang tunggak antara lain air, gula, CMC. Bahan kimia untuk analisa seperti aquades, kertas saring Whatman No. 41, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), etanol 96%, NaOH 0,1 N, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Na.k.Tartrat,

CuSO<sub>4</sub>, HCl 37%, BSA (*Bovine Serum Albumin*), folin dan petrolium benzene yang diperoleh dari laboratorium Ilmu dan Teknologi Pangan, Universitas Muhammadiyah Malang.

### 3.3 Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan sampel penelitian yaitu kecambah kacang tunggak dan daun pandan wangi yang akan diaplikasikan pada produk sari kecambah kacang tunggak untuk melihat pengaruh yang akan dihasilkan dari kecambah kacang tunggak dan daun pandan wangi terhadap sari kecambah kacang tunggak yang dihasilkan.

Rancangan Percobaan yang akan digunakan adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK), yang disusun secara faktorial menggunakan 2 faktor yaitu faktor I adalah perbedaan umur kecambah kacang tunggak dalam pembuatan sari kecambah kacang tunggak (24 jam, 48 jam, 72 jam) dan faktor II adalah perbedaan konsentrasi pandan wangi dalam pembuatan sari kecambah kacang tunggak (0%, 1%, 2%, 3%). Secara rinci faktor perlakuan penelitian sebagai berikut :

- a. Faktor I yaitu perbedaan umur kecambah kacang tunggak dalam pembuatan sari kecambah kacang tunggak (b/v).

F1 : Kecambah selama 24 jam

F2 : Kecambah selama 48 jam

F3 : Kecambah selama 72 jam

- b. Faktor II yaitu perbedaan konsentrasi pandan wangi pada pembuatan sari kecambah kacang tunggak (b/v).

P0 : Penambahan Pandan Wangi 0%

P1 : Penambahan Pandan Wangi 1%

P2 : Penambahan Pandan Wangi 2%

P3 : Penambahan Pandan Wangi 3%

Tabel 8. Matriks kombinasi penggunaan perbedaan umur kecambah kacang tunggak dan perbedaan konsentrasi pandan wangi pada sari kecambah kacang tunggak

Umur Kecambah		F1	F2	F3
Daun Pandan Wangi	P0	F1P0	F2P0	F3P0
	P1	F1P1	F2P1	F3P1
	P2	F1P2	F2P2	F3P2
	P3	F1P3	F2P3	F3P3

Keterangan :

F1P0 = kecambah kacang tunggak 24 jam dan daun pandan wangi 0%

F2P0 = kecambah kacang tunggak 48 jam dan daun pandan wangi 0%

F3P0 = kecambah kacang tunggak 72 jam dan daun pandan wangi 0%

F1P1 = kecambah kacang tunggak 24 jam dan daun pandan wangi 1%

F1P2 = kecambah kacang tunggak 24 jam dan daun pandan wangi 2%

F1P3 = kecambah kacang tunggak 24 jam dan daun pandan wangi 3%

F2P1 = kecambah kacang tunggak 48 jam dan daun pandan wangi 1%

F2P2 = kecambah kacang tunggak 48 jam dan daun pandan wangi 2%

F2P3 = kecambah kacang tunggak 48 jam dan daun pandan wangi 3%

F3P1 = kecambah kacang tunggak 72 jam dan daun pandan wangi 1%

F3P2 = kecambah kacang tunggak 72 jam dan daun pandan wangi 2%

F3P3 = kecambah kacang tunggak 72 jam dan daun pandan wangi 3%

Penelitian menghasilkan 12 kombinasi perlakuan yang diulang sebanyak 3 kali ulangan. Analisa yang dilakukan antara lain adalah analisa bahan baku kacang tunggak meliputi kadar protein dan antioksidan sedangkan analisa bahan baku pandan wangi meliputi daya antioksidan dan nilai pH serta analisa produk yang meliputi kadar air, kadar protein, kadar lemak, total padatan terlarut, pH, antioksidan dan organoleptik (rasa, aroma dan kenampakan).

### **3.4 Prosedur Penelitian**

Penelitian terdiri dari 2 kegiatan. Kegiatan pertama adalah proses perkecambahan kacang tunggak dengan waktu 24 jam, 48 jam, dan 72 jam. Kegiatan kedua adalah proses pembuatan sari kecambah kacang tunggak dengan perbedaan konsentrasi pandan wangi (0%, 1%, 2%, 3%) yang selanjutnya akan dilakukan uji mutu pada sari kecambah kacang tunggak.

### **3.5 Tahap Penelitian**

#### **3.2.2 Perkecambahan Kacang Tunggak**

Proses perkecambahan dari kacang tunggak dilakukan dengan metode yang dilakukan oleh Andarwulan dan Haryadi (2004) dengan adanya modifikasi, yakni kacang tunggak yang akan digunakan terlebih dahulu disortasi untuk memisahkan antara biji yang baik dengan biji yang rusak dan juga kotoran yang terikut. Setelah disortasi, biji selanjutnya dicuci agar bersih dari kotoran yang masih tersisa sehingga biji benar-benar bersih dari kotoran yang masih tersisa. Biji yang telah bersih kemudian direndam selama 1 jam untuk meningkatkan kadar air biji dan untuk melunakkan biji. Setelah mengalami perendaman kemudian disebarkan pada nampan yang berisi kapas yang telah dibasahi kemudian didekembangkan selama 24 jam, 48 jam dan 72 jam di dalam ruang gelap namun

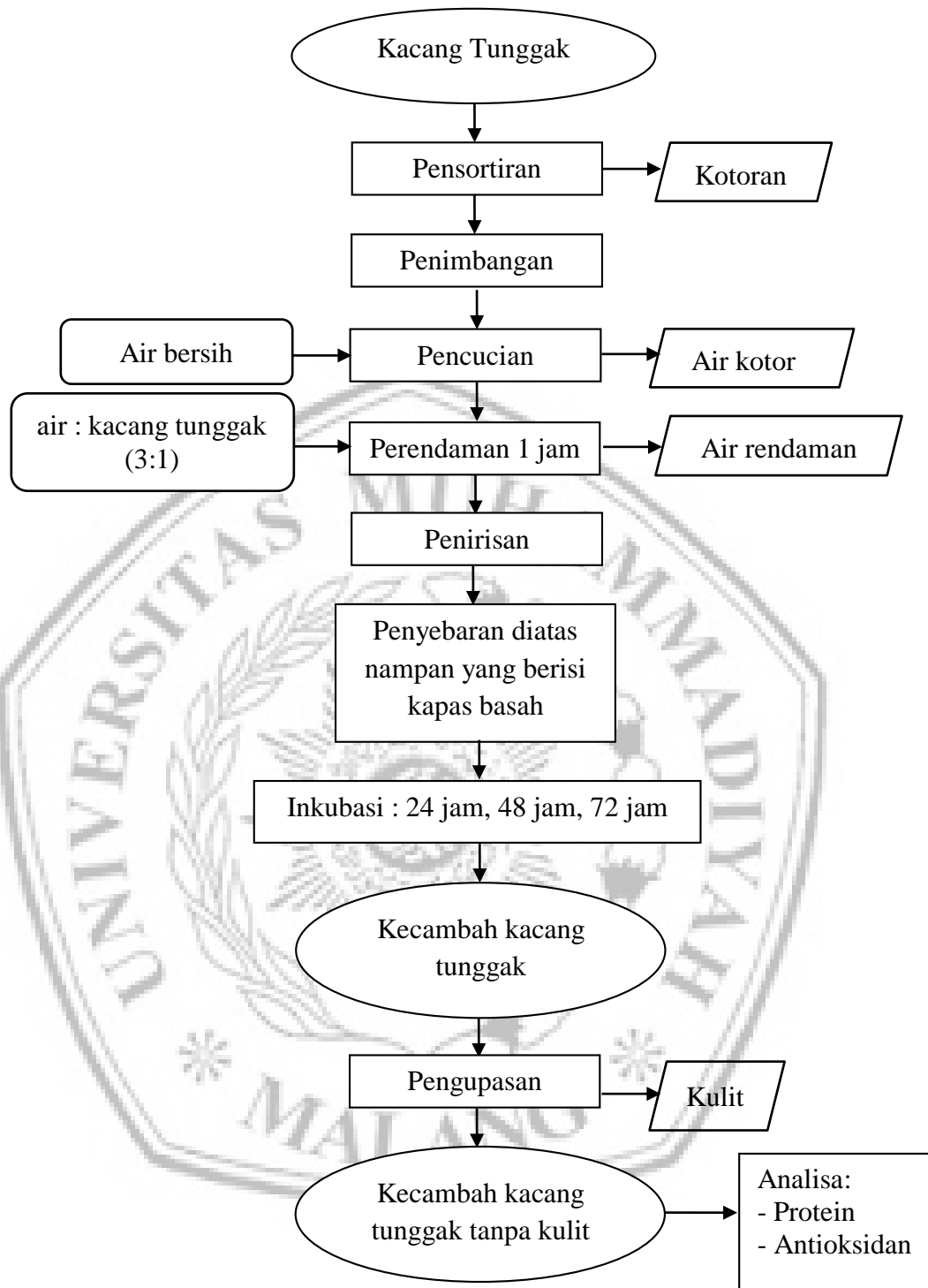
cukup ventilasi. Selama inkubasi, biji kacang tunggak sesekali disiram dengan air bersih sehari sekali kali yaitu pagi sehingga kelembaban untuk perkecambahan dapat terjaga. Diagram alir proses pembuatan kecambah dapat dilihat pada Gambar 6.

### 3.5.2 Pembuatan Sari Kecambah Kacang Tunggak

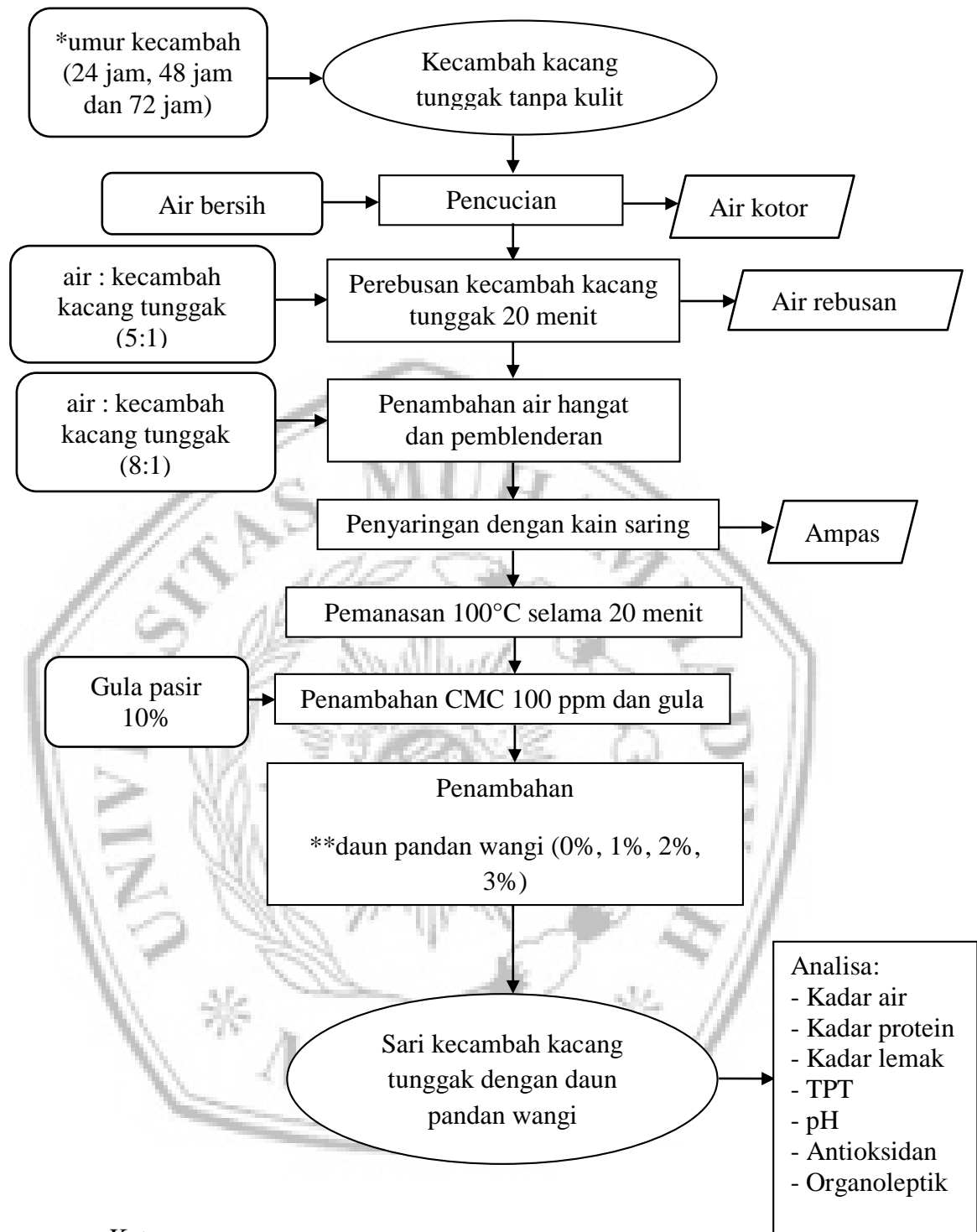
Proses pembuatan sari kecambah kacang tunggak dilakukan dengan metode yang dilakukan Amrin (2005) dengan adanya modifikasi yakni:

- a. Pemisahan bahan. Bahan yang dibutuhkan disiapkan sesuai dengan kebutuhan, kemudian disortasi (memisahkan bahan dengan kotoran, bahan yang rusak dengan yang baik). Kotoran dan bahan yang rusak dibuang agar didapatkan hasil yang sesuai dengan keinginan.
- b. *Blanching*. Kecambah yang sudah dibersihkan, diblanshing pada suhu 80°C selama 20 menit.
- c. Penghancuran dan penyaringan. Kecambah dihancurkan dengan blender selama  $\pm 5$  menit sampai menjadi pasta yang halus. Volume air yang ditambahkan dalam pembuatan sari ini adalah 1 : 8 (Kecambah : air).
- d. Penyaringan. Filtrat selanjutnya disaring menggunakan kain saring.
- e. Penambahan CMC 100 ppm dan gula sesuai pelakuan, kemudian dipanaskan sampai mendidih dan api dikecilkan dan dipanaskan selama 20 menit.
- f. Penambahan *essence* alami daun pandan wangi (0%, 1%, 2%, 3%) dengan pemanasan api kecil selama 5 menit. Perhitungan persentasenya adalah berat per volume.

Diagram alir proses pembuatan sari kecambah kacang tunggak dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 6. Diagram Alir Proses Pembuatan Kecambah Kacang Tunggak (Andarwulan dan Haryadi, 2004) dengan Modifikasi.



Keterangan:

\*perlakuan faktor I

\*\*perlakuan faktor II

Gambar 7. Diagram Alir Proses Pembuatan Sari Kecambah Kacang Tunggak dengan Penambahan Daun Pandan Wangi (Amrin, 2005) dengan Modifikasi.

### **3.6 Pengujian Parameter**

#### **3.6.1 Penentuan Kadar Air (Sudarmadji, dkk., 2003)**

1. Cawan bersih kosong dikeringkan dalam oven bersuhu kurang lebih 100°C selama 5 jam.
2. Didinginkan cawan konstan ke dalam desikator selama kurang lebih 15 menit dan kemudian menimbang berat cawan kosong.
3. Bahan sampel ditimbang sebanyak 2 gram dengan menggunakan cawan yang telah diketahui beratnya dan dioven kembali pada suhu 100°C selama 5 jam. Selanjutnya cawan berisi sampel didinginkan ke dalam desikator selama 15 menit, lalu bahan tersebut ditimbang. Kadar air dihitung dengan menggunakan rumus berikut:

$$\text{Kadar Air (\%)} = \frac{\text{berat akhir} - \text{berat cawan}}{\text{Berat sampel}} \times 100\%$$

#### **3.6.2 Penentuan Kadar Protein Metode Lowry (Andarwulan, dkk., 2011)**

##### **3.6.2.1 Preparasi Sampel**

1. Sampel 20 mg diambil dan dilarutkan dalam 10 ml aquades.
2. Secara merata dicampur, kemudian di sentrifugasi pada 3000 rpm selama 10 menit sampai protein yang terdenaturasi mengendap.
3. Supernatan kemudian dibuang dengan cara dekantasi.

##### **3.6.2.2 Pereaksi**

1. Natrium karbonat 2 % dalam larutan NaOH 0,1 % N pereaksi (1).
2. Tembaga sulfat 0,5 % dalam larutan Na. K tartrat pereaksi (2) (dibuat hanya pada waktu akan digunakan).
3. Campuran 50 ml pereaksi (1) dengan 1 ml pereaksi (2) (hanya pada waktu akan digunakan, hanya stabil selama 1 hari).



4. Pereaksi Folin Ciocalteau (Pereaksi Fenol). Biasanya tersedia secara komersil, larutkan dengan air 1:1 sebelum digunakan (3).
5. Larutan protein standar 0,25 mg/ml (*larutan bovine serum albumin*) (4).

### **3.6.2.3 Pembuatan Kurva Standar**

1. Sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi : 0 (blanko), 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 dan 1.0 ml protein standar. Ditambahkan air sampai volume total masing-masing 4 ml ke dalam tabung reaksi tambahkan 5,5 ml pereaksi (3), campur merata dan biarkan selama 10-15 menit pada suhu kamar.
2. 0,5 ml pereaksi (4) ditambahkan ke dalam masing-masing tabung reaksi, kocok merata dengan cepat sesudah penambahan.
3. Sampel dibiarkan selama 30 menit sampai warna biru terbentuk.
4. Absorbansinya diukur pada 600 nm dengan menggunakan spektrofotometer.
5. Kurva standar dibuat dengan memplotkan konsentrasi larutan bovine pada sumbu x dan absorbansi pada sumbu y. Dengan menggunakan regresi linier, maka akan diperoleh persamaan linier.

### **3.6.3 Penentuan Kadar Lemak Metode Hidrolisis Asam (Khasani, 2004)**

1. Cawan kosong disiapkan dan ditimbang beratnya.
2. Disiapkan sampel 2 g, ditambahkan 4 ml etanol 96%, ditambahkan kembali HCl 10 ml (25 HCL + 11 aquaedes).
3. Diletakkan pada waterbath pada suhu 70°C selama 30 – 40 menit, kemudian Ditambahkan etanol 10 ml.
4. Dinginkan, kemudian tambahkan dengan petroleum benzene sebanyak 25 ml kemudian vortek selama 1 menit.

5. Kemudian terjadi 2 lapisan. Lapisan atas diambil sedangkan untuk lapisan bawah dibuang.
6. Cawan porselin dikeringkan kedalam oven kemudian ditimbang. Kadar lemak dihitung dengan menggunakan rumus berikut:

$$\text{Kadar Lemak (\%)} = \frac{\text{cawan akhir} - \text{cawan kosong}}{\text{Berat sampel}} \times 100\%$$

#### **3.6.4 Penentuan Total Padatan Terlarut (Yuwono dan Susanto, 2001)**

1. Alat dan bahan disiapkan, penutup kaca prisma dibuka, lalu diteteskan satu tetes aquades dengan menggunakan pipet tetes, menutup kaca prisma perlahan dan memastikan aquades memenuhi kaca prisma.
2. Refraktometer diarahkan ke cahaya terang, melihat pembacaan skala dapat melalui lubang teropong, jika skala kabur, putar lubang teropong dan pastikan garis biru tepat pada 0° Brix.
3. Setelah dilakukan kalibrasi, kaca prisma dibuka dan dibersihkan dengan menggunakan bahan lembut dan kering dengan cara diusap satu arah.
4. Kaca prisma dibuka kembali kemudian meneteskan sampel sebanyak 1 tetes kemudian tutup kaca prisma.
5. Skala dilihat melalui lubang teropong, batas garis skala adalah antara garis putih dan biru.

#### **3.6.5 Analisis pH (BSN, 2004)**

1. pH meter dinyalakan.
2. Elektroda dan *temperature probe* dibersihkan dan dibilas dengan menggunakan aquades dan mengeringkannya.
3. Elektroda dicelupkan kedalam contoh sampel uji sampai pH meter menunjukkan pembacaan yang tetap.

4. Hasil pembacaan skala atau angka pada tampilan dari pH meter dicatat.
5. Elektroda dibilas dengan aquades dan kemudian dikeringkan.

### **3.6.6 Penentuan Aktivitas Antioksidan Metode *Radical Scavenging Activity***

**(Khasani, 2004)**

1. Serbuk DPPH dilarutkan sebanyak 1,182 mg ke dalam 50 mL metanol.
2. 1 mL 0,1 mP DPPH dipipet dan ditambahkan dengan 1 mL senyawa uji.
3. Dilakukan pengenceran dengan methanol sampai 5 mL.
4. Campuran larutan tersebut dihomogenkan dengan *vortex* selama 10 detik.
5. Selanjutnya, larutan tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit.  
Selama proses reduksi oleh antioksidan, larutan DPPH radikal akan berubah warna dari ungu menjadi kuning pucat.
6. Dilakukan pengukuran absorbansi dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 517 nm (As).
7. Digunakan larutan blanko yang terdiri dari 4 mL metanol dalam 1 mL DPPH dan mengukurnya pada panjang gelombang yang sama (Ab). Trolox digunakan sebagai kontrol positif. Perlakuan pada uji DPPH ini dengan tiga kali pengulangan (triplicate). Menghitung aktivitas penghambatan radikal dengan rumus di bawah ini:

$$\text{Aktivitas Antioksidan (\%)} = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

### **3.6.7 Uji Organoleptik (Rahayu, 2001)**

1. Sampel yang akan diuji disiapkan.
2. Disiapkan 15-25 orang panelis.
3. Dibagikan form penilaian kepada panelis.
4. Panelis dipersiapkan untuk menguji sampel dan mengisi form penilaian.

**Tabel 9. Skor Organolaptik**

No	Skor Rasa	Skor Aroma	Skor Kenampakan
1	Sangat tidak enak	Sangat tidak suka	Sangat tidak menarik
2	Tidak enak	Tidak suka	Tidak menarik
3	Enak	Suka	Menarik
4	Sangat enak	Sangat suka	Sangat menarik

Pengujian dilakukan dengan memberikan sampel sari kecambah kacang tunggak secara acak, 12 macam sampel yang masing – masing telah diberi kode yang berbeda kepada 25 panelis. Selanjutnya, panelis diminta memberi penilaian terhadap sampel sesuai skala hedonik yang ada.

### **3.7 Analisis Data**

Data hasil pengamatan penelitian utama dianalisis menggunakan metode rancangan acak kelompok yang diolah menggunakan “Microsoft Excel”. Pengolahan data pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan analisis sidik ragam (ANOVA) pada taraf 5% dan 1%. Selanjutnya bila terjadi perbedaan secara nyata akan dilanjutkan dengan uji DMRT (*Duncan's Multiple Range Test*) pada taraf 5% guna menentukan level/perlakuan terbaik dari masing-masing. Penentuan perlakuan terbaik dengan metode uji efektivitas De Garrno, dkk., (1984).

Tahapan penentuan perlakuan terbaik adalah sebagai berikut:

1. Variabel disusun berdasarkan prioritas dan kontribusi terhadap hasil.
2. Diberikan bobot nilai (BV) pada masing-masing variabel sesuai dengan kontribusinya dengan angka relatif 0-1.
3. Ditentukan bobot normal (BN) dengan membagiBV dengan jumlah semua bobot variabel.

4. Variabel-variabel yang dianalisis dikelompokkan menjadi 2 kelompok yaitu (a) variabel yang semakin besar reratanya semakin baik dan (b) variabel yang semakin besar reratanya semakin jelek.

5. Nilai Efektivitas (Ne) dihitung dengan rumus:

$$Ne = \frac{\text{Nilai perlakuan} - \text{Nilai terendah}}{\text{Nilai tertinggi} - \text{Nilai terendah}}$$

Nilai Hasil = Ne x Bobot Normal.

